

(19) JAPANESE PATENT OFFICE (JP)

(11) Publication Number

(12) THE LAID-OPEN PATENT GAZETTE (A)

**H3-101688**

(43) Publication date: 26 April 1991

(51) Int. Cl. <sup>5</sup>	Identification Code	Office File Nos.
C 07 H 1/06		8413-4C
B 01 D 11/04	C	6525-4D
C 07 H 21/04	Z	7822-4C
C 12 N 15/10	ZNA	
C 12 P 19/34	Z	8214-4B
		8717-4B C 12 N 15/00 A

Examination request: Not yet received Number of claims: 4 (total 6 sheets)

(54) Title of the invention: Method for extraction or removal of nucleic acid

(21) Application No.: H1-237327

(22) Filed: 14 September 1989

(72) Inventor: Kamata Kazuya

Kanagawa-ken, Ebina-shi, Kawaraguchi 2398

(72) Inventor: Sakka Toshiaki

Kanagawa-ken, Yokohama-shi, Kanazawa-ku, Kamaritani 1200-6

(71) Applicant: Tosoh K.K.

Yamaguchi-ken, Shinnanyo-shi, Oaza Tomita 4560

**Specification****1. Title of the Invention**

Method for extraction or removal of nucleic acid.

**2. Scope of the Patent Claims**

- (1) Method for extraction of nucleic acid, wherein, after addition of a protein denaturing agent to a nucleic acid-containing sample, alcohol is added, then the precipitate is collected.
- (2) Method for removal of nucleic acid, wherein, after addition of a protein denaturing agent to a nucleic acid-containing sample, alcohol is added, then the precipitate is removed.
- (3) Method according to Claim (1), characterized in that the protein denaturing agent is a guanidine salt or urea.
- (4) Method according to Claim 1 or 2, characterized in that the alcohol is at least one alcohol selected from ethanol, propanol, butanol, pentanol or hexanol.

### **3. Detailed Description of Invention**

#### Field of Industrial Application

The present invention concerns a method for extraction or removal of nucleic acid from various nucleic acid-containing samples, such as biological samples.

#### Prior Art

In recent years, extraction of nucleic acid from biological samples has been widely performed in a variety of fields. For example, the operation of extracting mRNA or DNA from cells producing a desired protein, and also the operation of extracting DNA (or RNA) which is for example to be detected from biological samples in clinical diagnosis wherein viral DNA (or RNA) is detected using DNA probes, are performed in genetic engineering and in the preparation of DNA probes.

Hence, the operation of extracting nucleic acid is very important in a variety of fields.

Previously, for the extraction of nucleic acid, the method of for example adding a caustic reagent to the sample, then performing a phenol or chloroform/phenol extraction 1-3 times, and finally performing an ethanol precipitation, and the method of subjecting cells to the action of a surfactant and proteinase K, then performing a phenol extraction, and then performing an ethanol precipitation, are known. Further, as methods for extracting RNA, the method of adding guanidine thiocyanate to the cells, and performing a centrifugation in a centrifugation solution prepared to a specified density, and the methods of performing ion exchange column chromatography, gel filtration or electrophoresis are known. Moreover, kits or machines for the extraction of nucleic acid from biological samples are known. In these, either the protein is degraded using proteinase K at the same time as the cells are lysed, and the nucleic acid is extracted from the resulting solution using ion exchange column chromatography, or the sample is treated with proteinase K, then a phenol extraction is performed, and then an alcohol precipitation is performed.

#### Problems of the Prior Art

In methods such as the aforesaid for the extraction of nucleic acid, complex operations are necessary, and apart from the time taken, processing with hazardous solvents is necessary, and also there is a yield problem in that the quantity of nucleic acid obtained is small.

To be specific, in the method wherein a caustic reagent is added to the sample, then a phenol or chloroform/phenol extraction is performed 1-3 times, and finally an ethanol precipitation is performed, time is needed for its implementation because complex extraction operations are necessary, and hazardous alkaline reagents and organic solvents such as chloroform have to be used. In the method wherein a surfactant and proteinase K are used, then a phenol extraction is performed, and then an ethanol precipitation is performed, there is a problem in that time is needed for degradation of the protein by the proteinase K. In the method wherein guanidine thiocyanate is added to the cells, and a centrifugation is performed in a centrifugation solution prepared to a specified density, there is a problem in that the centrifugation operation takes about 1 day. In the methods wherein ion exchange column chromatography, gel filtration or electrophoresis is performed, there is a problem in that the operations are complex and take time to perform. In the methods described above, there are also problems in that because of the complexity of the operations, for example they are very difficult to automate. There are also problems concerning the kits or machines for the extraction of nucleic acid from biological samples, such as that because proteinase K is used, time is needed for it to react.

#### Means of Solving Problems

The present inventors, as a result of diligent studies concerning nucleic acid extraction methods wherein this can be effected by a simple operation, and complex operations are not necessary, managed to perfect the method of the present invention which has solved the problems seen in the prior art. By means of the present invention, a method for removing nucleic acid from samples is also simultaneously provided. In other words, the present invention is a method for extraction of nucleic acid, wherein, after addition of a protein denaturing agent to a nucleic acid-containing sample, alcohol is added, then the precipitate is collected, and, further it is a method for removing nucleic acid, wherein, after addition of a protein denaturing agent to a nucleic acid-containing sample, alcohol is added, then the precipitate is removed. Below, the invention is described in detail.

The method of the present invention concerns a method wherein nucleic acid such as DNA or RNA is extracted or removed from samples. Nucleic acid in the present specification means DNA and/or RNA, and these may be single-stranded or double-stranded, moreover its genetic properties are immaterial. For example, apart from genomic DNA, the DNA may be DNA

contained in mitochondria or chloroplasts, and the RNA may be messenger RNA or transfer RNA.

Concerning the nucleic acid-containing samples, biological samples such as tissue, cells, blood, bile, pus, spinal fluid, faeces, saliva and sputum, and also can be mentioned as examples. Concerning these samples, if the contained protein and nucleic acid are in a state where they cannot be contacted with the protein denaturing agent and alcohol, in other words if the sample has cell walls or cell membranes or is in an agglomerated state, as necessary homogenizing or surfactant treatment or ultrasonic treatment may for example be performed.

Next, the proteins in the sample are denatured and solubilised by the addition of a protein denaturing agent to the sample. There is no particular restriction as to the denaturing agent, and any can be used provided that it can degrade protein, however, guanidine salts or urea, whose action is outstanding, are ideal. As guanidine salts, for example guanidine thiocyanate, guanidine chloride and the like, and also organic salts of guanidine such as guanidine carbonate, can be used. *chaotropic*

The protein denaturing agent can be added to the sample in the solid state (powder, granules) or in the dissolved state, but if it is added in the solid state, a stirring operation should be *aqueous* performed so as to ensure that the protein in the sample is thoroughly denatured.

The protein denaturing agent is added so as to give a concentration capable of denaturing the protein in the sample at the time when it is added to the sample, and such that thereafter the nucleic acid forms a precipitate on addition of the alcohol. For example, if it is guanidine thiocyanate, since adequate denaturation of the protein does not occur below 1.5 M, and adequate precipitation of the nucleic acid on addition of alcohol does not occur above 6.5 M, it is added to the sample so as to give a concentration of about 2.0 M to 6 M, preferably 2.5 M to 5.5 M. If it is guanidine chloride, it can be added so as to give a concentration of 2 M or more, and there is no upper limit. In the case of urea, since adequate denaturation of the protein does not occur at about 4 M, it is added to the sample so as to give a concentration of 4.5 M or more, preferably 6 M or more. The concentrations described above are a general

condition for performing the present invention, and are preferably determined in the light of the amount of protein present in the sample when the present invention is performed.

Although the concentrations of protein denaturing agents are as described above, apart from these, for example the purpose of the present invention is also achieved by firstly adding the protein degrading agent to the sample so as to give a concentration at which the nucleic acid scarcely forms a precipitate on subsequent addition of alcohol, and, during a subsequent alcohol addition, adding a quantity of alcohol sufficient to dilute the degrading agent to a concentration at which the nucleic acid forms a precipitate.

Next, the nucleic acid is precipitated by adding an alcohol to the sample solution containing the protein degrading agent. The alcohols may be exemplified by ethanol, n-propanol, iso-propanol, n-butanol, sec-butanol, tert-butanol, n-amyl alcohol, isoamyl alcohol and tert-amyl alcohol.

*butanol*

The alcohol may be added so as to give a concentration that causes nucleic acid precipitation without causing deposition of the protein denatured by the denaturing agent and present in the solubilized state, but the specific amount added depends on the nature of the alcohol used. With alcohols with longer alkyl chains, in other words, alcohols of higher hydrophobicity, the nucleic acid can be precipitated by the addition of smaller amounts. Hence, when performing the present invention, it is preferable to investigate the ideal amount to add by performing an experiment using the alcohol that is to be used.

---

Among the specific alcohols stated above that can be used in the present invention, with those other than ethanol and isopropanol, it is known that phase separation from aqueous phases such as buffer solutions occurs. However, in the present invention, if these alcohols are added to a solution containing a guanidine salt, a homogeneous phase is formed, and phase separation does not occur. In the present invention, in order to cause phase separation, the solubility of the alcohol in the said solution may be decreased for example by adding a salt such as common salt.

By means of the above operations, the nucleic acid contained in the sample forms a precipitate, whereas the protein is present in the solution in the dissolved state owing to the

action of the protein denaturing agent. Consequently, after the method of the present invention has been implemented, it is possible to extract or remove the nucleic acid for example by performing a centrifugal separation or membrane separation. Concerning the nucleic acid extracted, there is no restriction whatever for example as regards washing after the present invention with aqueous alcohol solutions and the like not containing the protein denaturing agent. Further, concerning the protein denaturing agent solution after the nucleic acid has been removed according to the present invention, there is no restriction whatever for example as regards decreasing the denaturing agent concentration by performing dialysis and the like after the implementation of the present invention.

#### Effect of the Invention

The present invention can be implemented without the use of hazardous organic solvents, indeed merely by the operations of adding a protein denaturing agent, and an alcohol to the sample, and subsequent separation or removal of the precipitate. Hence, the time needed for its implementation is also very short, and it has become possible rapidly to perform the operation of nucleic acid extraction or removal for which  $\frac{1}{2}$  a day to 2 days were previously necessary. Because of this, it is a particularly useful method in fields such as genetic engineering, where it is necessary to extract nucleic acid from large amounts or large numbers of samples.

Since, as stated above, the present invention can be implemented by very simple operations, it can also be automated.

---

Further, in the present invention, it is possible to perform all operations in the same reaction vessel; moreover, since it is not necessary to separate or remove the precipitate by column chromatography or the like, sample losses are small, hence it is possible to extract nucleic acids in high yield, or to remove the nucleic acids without loss of protein. The fact that it is possible to perform all operations in the same reaction vessel means that for example if the nucleic acid to be extracted or removed is hazardous viral DNA or the like, and the sample is cells infected with the said virus, it is possible to minimize contamination with these.

### **Practical Examples**

Below, in order to explain the present invention in more detail, practical examples are given, however these practical examples are an illustration, and do not limit the present invention.

#### **Practical Example 1**

K562 cells, which are human leucocyte cancer cells (these cells are well-known and can be purchased for example from Dai-Nippon Pharmaceutical (Ltd.)) were cultured in PRMI-1640 culture medium containing 1 % foetal bovine serum. On attainment of 500,000 cells per ml of culture suspension, 1 ml of suspension was collected in a sampling tube, and the cells in the precipitate were recovered by centrifuging for 5 minutes at 500 rpm.

After addition of 0.4 ml of 10 mM Tris hydrochloride buffer solution (pH 8.0) containing 5 M guanidine thiocyanate and 1 mM EDTA to the cells, the mixture was stirred for 1 minute at room temperature, and then 1 ml of 99.5% ethanol was added. Next, this solution was centrifuged for 5 minutes at 15,000 rpm, and the nucleic acid was extracted in the precipitate.

The supernatant was discarded, and after addition of 70% ethanol to the precipitate and washing, the nucleic acid was obtained by drying.

As a result of the action of restriction enzymes (Bam HI, Eco RI, Alu I), RNase and DNase on the nucleic acid extracted as above, it was found that the reactions due to these enzymes were not inhibited; further, replication with DNA polymerase using the extracted nucleic acid as the template was also not inhibited. These results show that restriction enzyme inhibiting substances such as histones have been removed.

#### **Practical Example 2**

K562 cells which are human leucocyte cancer cells were cultured in the same way as in Practical Example 1. On attainment of 500,000 cells per ml of culture suspension, 1 ml of suspension was collected in a sampling tube, and the cells in the suspension were recovered by centrifuging for 5 minutes at 500 rpm.

After the centrifugation, the supernatant was discarded, and after addition of 0.4 ml of 10 mM Tris hydrochloride buffer solution (pH 8.0) containing 5 M guanidine thiocyanate and 1 mM

EDTA to the cells, the mixture was stirred for 1 minute at room temperature, and then 1 ml of 99.5% ethanol was added. Next, the nucleic acid was recovered by filtering this solution with a tetrafluoroethylene membrane (Norton Ltd, ZITEX, pore diameter = midum).

After the filtration, this membrane was washed with 70% ethanol and the nucleic acid in the buffer solution was obtained by drying.

When the same tests as in Practical Example 1 were performed on the nucleic acid extracted as above, all the reactions were achieved with no inhibition.

### **Practical Example 3**

E. coli JM109 strain transformed with the plasmid pIBI176 (IBI Ltd.) was cultured in LB culture medium.

On attainment of  $10^8$  cells per ml of culture suspension, 0.1 ml of this was collected in a sampling tube, and after addition of 0.3 ml of 8 M guanidine chloride, it was stirred for 1 minute. After stirring, 0.2 ml of 99.5 % isopropanol were added, and after stirring the nucleic acid was extracted by centrifuging for 5 minutes at 15,000 rpm.

The supernatant was discarded, and the precipitate was washed twice with 70% ethanol, then dissolved in 0.4 ml of 10 mM Tris hydrochloride buffer (pH 8.0) containing 1 mM EDTA, and after centrifuging for 5 minutes at 15,000 rpm, the impurities were removed.

---

1 ml of 99.5% ethanol was added to the supernatant obtained as aforesaid, the precipitate obtained by centrifugation for 5 minutes at 15,000 rpm was dried, and when the same tests as in Practical Example 1 were performed, it was found that all the enzyme reactions were achieved with no inhibition.

### **Practical Example 4**

K562 cells, which are human leucocyte cancer cells, were cultured in LB culture medium.

On attainment of 500,000 cells per ml of culture suspension, 1 ml of suspension was collected in a sampling tube, and the cells were recovered by centrifuging for 5 minutes at 500 rpm.

After addition of 0.4 ml of 10 mM Tris hydrochloride buffer solution (pH 8.0) containing 8 M urea and 1 mM EDTA to the precipitate, the mixture was stirred for 1 minute at room temperature, and then 1 ml of 99% secondary butyl alcohol was added. Next, this solution was filtered with a similar tetrafluoroethylene membrane to that used in Practical Example 2. After the filtration, this membrane was washed with 70% ethanol and the nucleic acid in the buffer solution was obtained by drying.

When the same tests as in Practical Example 1 were performed on the nucleic acid extracted as above, all the reactions were achieved with no inhibition.

#### **Practical Example 5**

BLV (bovine leucocyte virus: Virology, Vol.138, p.82, 1984) DNA was integrated into M13 phage (Takara Ltd.) at a Bam HI site. For reference, a part of the BLV DNA is shown in Figure 1.

The M13 phage having 1 ng of DNA was added to 100 µl of bovine serum, 300 µl of 6 M guanidine isocyanate were added to this serum, and the mixture was stirred for 1 minute.

After addition of 10 µl of 10 mg/ml salmon DNA as carrier and 1 ml of ethanol to this solution, it was stirred for 1 minute, and centrifuged for 5 minutes at 15,000 rpm. The supernatant was discarded, and the precipitate was dried, and dissolved in 50 µl of 10 mM Tris hydrochloride buffer solution (pH 8.0) containing 1 mM EDTA.

---

Synthetic DNA having the complementary sequence to the aforesaid base sequence made up of the base sequence shown in Figure 2 was prepared using a DNA synthesizer (Applied Bio-systems Ltd.). The 5' terminus of the DNA prepared was aminated, and alkaline phosphatase was bonded to it. The aforesaid sequence was detected by the dot blotting method using this DNA as the probe.

With the M13 phage DNA, a coloration was observed, but with the bovine serum used as a control no coloration whatever was observed. This shows that, it is possible to detect minute amounts of DNA (BLV DNA) from highly concentrated protein solutions (bovine serum) by means of the present invention.

#### 4. Brief Description of the Diagrams

Figure 1 is a diagram showing the part of the BLV DNA used in Practical Example 5 of the present invention. The symbols in the diagram mean the same as the symbols used in normal genetic engineering. Further, in the diagram, the regions underlined indicate the regions which specifically pair with the DNA shown in Figure 2.

Figure 2 shows the DNA base sequence which specifically pairs with the underlined regions in the DNA used in Practical Example 5 of the present invention, which is shown in Figure 1.

Patent Applicant Tosch K.K.

Fig.1-1

```
(5')  
G A C C C T A G G G C C A T C A T C C A  
C T G G G A T C C C G G T A G T A G G T  
G C T T T C C C C G G A A C A G C T G C  
C G A A A G G G G C C T T G T C G A C C  
A A G G C A T T G C A G A G C T T C G A  
T T C C G T A A C G T C T C G A A G C T  
C A A G C C C T G T C C C A C A A C G C  
G T T C G G G A C A G G G T G T T G C G  
A A G A T C T A G A T A T A A C G A G C  
T T C T A G A T C T A T A T T G C T C G  
A A G A A C C C C T G C T A G C C T A C  
T T C T T G G G G A C C G A T C G G A T G
```

Fig.1-3

```
260  
C T G C T G G G A T G C C A A T A C C T  
G A C G A C C C T A C G G T T A T G G A  
280  
G C A G A C T C A G G C C T T A A G C T  
C G T C T G A G T C C C G G A A G G C G A  
300  
C C G T A T G C C A A G C C C A T A C T C  
G C A T A C G G T T C G G G T A T G A  
320  
A A A T A T T A T C A C A A T C T T C C  
T T T A T A A T A G T G T T A G A A G G G  
(3')
```

Fig.1-2

```
140  
G T A C A C C T A A C C C G G G C G G G G  
C A T G T G G A T T G G G C C C G C C C  
160  
G T C C A C C C T G G T A C T C T T C C  
C A G G T G G G A C C A T G A G A A G G  
180  
A A A A G G G G C C T C A A T T T C C C  
T T T T C C C G C G A G T T A A A G G G  
200  
C T G G C C T A C T T T C A G A C C C C  
G A C C G G A T G A A A G T C T G G G G  
220  
C T T G A C T G A C A A C C A A G C C T  
G A A C T G A C T G T T G G T T C G G A  
240  
C A C C T T G G G G C C T C C T T C T C  
G T G G A A C C C C G G A G G A A G A G
```

Fig.2

```
(5')  
A G A G G T T T T A G G A A G A T T G T  
G A T A  
(3')
```

BA

⑨ 日本国特許庁 (JP)

⑩ 特許出願公開

## ⑪ 公開特許公報 (A) 平3-101688

⑫ Int. Cl.<sup>5</sup>

C 07 H 1/06  
 B 01 D 11/04  
 C 07 H 21/04  
 C 12 N 15/10  
 C 12 P 19/34

識別記号

ZNA  
 Z

府内整理番号

8413-4C  
 6525-4D  
 7822-4C  
 8214-4B  
 8717-4B

⑬ 公開 平成3年(1991)4月26日

C 12 N 15/00 A  
 審査請求 未請求 請求項の数 4 (全6頁)

⑭ 発明の名称 核酸の抽出又は除去方法

⑮ 特願 平1-237327

⑯ 出願 平1(1989)9月14日

⑰ 発明者 鎌田 和弥 神奈川県海老名市河原口2398

⑱ 発明者 目利明 神奈川県横浜市金沢区釜利谷1200-6

⑲ 出願人 東ソー株式会社 山口県新南陽市大字富田4560番地

## 明細書

## 1 発明の名称

核酸の抽出又は除去方法

## 2 特許請求の範囲

(1) 核酸を含有する試料に蛋白質変性剤を添加した後アルコールを添加し、次いで沈殿を回収することからなる核酸の抽出方法

(2) 核酸を含有する試料に蛋白質変性剤を添加した後アルコールを添加し、次いで沈殿を除去することからなる核酸の除去方法

(3) 蛋白質変性剤がグアニジン塩又は尿素であることを特徴とする請求項第(1)項記載の方法

(4) アルコールがエタノール、プロパンノール、ブタノール、ペンタノール又はヘキサンノールから選ばれる少なくとも一のアルコールであることを特徴とする請求項第(1)又は第(2)項記載の方法

## 3 発明の詳細な説明

## (産業上の利用分野)

本発明は、生体試料等の核酸を含有するさまざまな試料から核酸を抽出又は除去する方法に関する。

## (従来の技術)

近年、種々の分野において、生体試料からの核酸の抽出が盛んに行われている。例えば遺伝子工学やDNAプローブの作製においては、目的とする蛋白質を生産する細胞からmRNAやDNAを抽出する操作が、またDNAプローブを用いて例えばウイルスDNA(RNA)を検出する臨床診断においては生体試料から検出されるべきDNA(RNA)を抽出する操作が行われる。

以上の様に、核酸を抽出する操作は種々の分野において非常に重要なものである。

従来、核酸の抽出は、例えば苛性試薬を試料に添加し、次いでフェノール又はクロロホルム/フェノール抽出を1~3回行い、最終的にエタノール沈殿を行う方法や、細胞に界面活性剤とプロテ

イナーゼKを作用させ、次いでフェノール抽出を行い、更にエタノール沈殿を行う方法が知られている。また、RNAを抽出する方法として、細胞にチオシアン酸グアニジンを添加し、一定の密度に調製した遠心溶液中で超遠心を行う方法や、イオン交換カラム、ゲル通過あるいは電気泳動を行う方法が知られている。更には生体試料からの核酸の抽出キットや抽出装置が知られている。これらは、例えばプロテイナーゼKを使用して細胞を溶解すると同時に蛋白質を分解し、得られる溶液からイオン交換カラムを用いて核酸を抽出するものか、又は試料をプロテイナーゼKで処理し、次いでフェノール抽出を行い、更にアルコール沈殿を行うものである。

## (従来技術の課題)

前記した様な核酸の抽出方法では、繁雑な操作が必要であり、時間がかかるうえに危険な有機溶媒での処理を必要とし、しかも、得られる核酸の量が少ないという収率的な課題がある。

具体的に、苛性試薬を試料に添加し、次いでフ

る。

## (課題を解決するための手段)

本発明者らは、簡便な操作により実施可能であり、かつ繁雑な操作の必要ない核酸の抽出方法について鋭意検討した結果、従来の技術に見られる課題を解決した本発明の方法を完成するに至った。本発明によれば、試料から核酸を除去する方法も同時に提供される。即ち本発明は、核酸を含有する試料に蛋白質変性剤を添加した後アルコールを添加し、次いで沈殿を回収することからなる核酸の抽出方法であり、また、核酸を含有する試料に蛋白質変性剤を添加した後アルコールを添加し、次いで沈殿を除去することからなる核酸の除去方法である。以下、本発明を詳細に説明する。

本発明の方法は、試料からDNAやRNA等の核酸を抽出又は除去する方法に関するものである。本明細書でいう核酸とは、DNA及び/又はRNAを意味するが、それらは一重鎖であっても二重鎖であってもよく、またその遺伝学的な性質に拘りがない。例えばDNAはゲノムDNAの他、

エノール又はエノール/クロロホルム抽出を1~3回行い、最終的にエタノール沈殿を行う方法では、繁雑な抽出操作が必要なことから実施に時間がかかり、かつ危険なアルカリ性試薬やクロロホルム等の有機溶媒を使用しなければならない。界面活性剤とプロテイナーゼKを作用させ、次いでフェノール抽出を行い、更にエタノール沈殿を行う方法では、プロテイナーゼKによる蛋白質の分解に時間がかかるという課題がある。細胞にチオシアン酸グアニジンを添加し、一定の密度に調製した遠心溶液中で超遠心を行う方法では、遠心分離操作におよそ1日かかるという課題がある。イオン交換カラム、ゲル通過あるいは電気泳動を行う方法では、操作が繁雑であり、かつその実施には時間がかかるという課題がある。以上説明した方法においては、操作の繁雑性のため、例えばその操作を自動化することが非常に困難であるという課題もある。生体試料からの核酸の抽出キットや抽出装置についても、プロテイナーゼKを使用するためその反応に時間がかかる等の課題があ

ミトコンドリアや葉緑体に含有されるDNAであっても良く、RNAはメッセンジャーRNAやトランスマーカーRNAであっても良い。

核酸を含有する試料については、組織、細胞、血液、胆汁、腹汁、膿液、糞便、唾液、喀痰等の生体試料、更にはを例示できる。これらの試料について、含有される蛋白質や核酸が蛋白質変性剤やアルコールと接触接できない状態、即ち試料が細胞壁や細胞膜を有しているか塊状になっている場合等には、必要に応じて例えばホモジナイズや界面活性剤処理あるいは超音波処理を実施すると良い。

次に、試料に蛋白質変性剤を添加して、試料中の蛋白質を変性可溶化させる。変性剤としては、蛋白質を変性させることができるものであれば格別の制限なく使用することが出来るが、その作用が顕著であるグアニジン塩又は尿素は好適である。グアニジン塩としては、例えばチオシアン酸グアニジンや塩酸グアニジン等、更には炭酸グアニジン等の有機のグアニジン塩を使用することが出来

る。

蛋白質変性剤は、固形状（粉状、粒状）又は溶液状にて試料に添加すれば良いが、固形状にて添加した場合には攪拌操作を実施して試料中の蛋白質を十分に変性させられる様にすると良い。

蛋白質変性剤は、試料に添加した時点では試料中の蛋白質を変性可能であり、かつ、後にアルコールを添加することにより核酸が沈殿を生ずる濃度となる様に添加する。例えばチオシアン酸グアニジンであれば、1.5M以下では蛋白質の変性が十分に起こらず、6.5M以上ではアルコールを添加した時に核酸の沈殿が十分に生じないため2.0Mから6M程度の濃度、好ましくは2.5Mから5.5Mとなる様に試料に添加する。塩酸グアニジンであれば、2M以上の濃度となる様に添加すれば良く、その上限については制限はない。尿素の場合には、4M程度では蛋白質の変性が十分に起こらないため、4.5M以上、好ましくは6M以上となる様に試料に添加する。以上に説明した濃度は本発明を実施するための一般的条件である。

が、その具体的な添加量は使用するアルコールの種類に依存する。アルキル鎖が長いアルコール即ち疎水性が高いアルコールほど少ない添加量で核酸を沈殿させることが出来る。従って、本発明を実施する際には、使用するアルコールを用いて試験を行い、適切な添加量を調査しておくことが好ましい。

前記した本発明で使用できる具体的なアルコールの中で、エタノール、iso-ブロパノール以外のものは緩衝液等の水相と相分離を起こすことが知られている。しかし、本発明において、グアニジン塩を含む溶液中にこれらアルコールを添加した場合には相分離が起こらず、均一相が形成される。本発明において相分離を形成させようとする場合には、溶液中に例えば食塩等の塩を添加し、該溶液へのアルコールの溶解度を低下させれば良い。

以上の操作により試料に含有されていた核酸は沈殿を生じるが、一方、蛋白質は蛋白質変性剤の働きにより溶解状態として溶液中に存在している。

り、本発明を実施する時に試料中に存在する蛋白質量等を考慮して決定することが好ましい。

蛋白質変性剤の濃度については以上に述べた通りであるが、それ以外にも、例えばまず、後のアルコールの添加で核酸が沈殿を生じにくい濃度となる様に蛋白質変性剤を試料に添加しておき、後のアルコールの添加操作の時点で変性剤が核酸が沈殿を生じる濃度まで希釈されるのに十分な量のアルコールを添加しても本発明の目的は達成される。

次に、蛋白質変性剤を含む試料溶液にアルコールを添加して核酸を沈殿させる。アルコールとしてはエタノール、n-ブロパノール、iso-ブロパノール、n-ブタノール、sec-ブタノール、tert-ブタノール、n-アミルアルコール、iso-アミルアルコール、tert-アミルアルコール等を例示することが出来る。

アルコールは、蛋白質変性剤により変性され、可溶化状態で存在する蛋白質を析出させずに核酸沈殿を生じさせる濃度となる様に添加すれば良い

従って、本発明の方法を実施した後に例えば遠心分離や膜分離等を実施することにより核酸を抽出又は除去することが可能である。

抽出された核酸について、例えば本発明の後に蛋白質変性剤を含まないアルコール水溶液等で洗浄する事等については何等制限はない。また、本発明により核酸が除去された後の蛋白質変性剤溶液についても、例えば本発明の実施後に透析等を実施して変性剤濃度を低下させる事等については何等制限はない。

#### (発明の効果)

本発明は、危険な有機溶媒を使用することなく、しかも試料への蛋白質変性剤、アルコールの添加とその後の沈殿の分離・除去操作のみで実施可能である。従って、その実施にかかる時間も極めて短時間であり、従来、半日から2日必要であった核酸の抽出又は除去操作がより迅速に実施可能となる。このため、大量のあるいは多数の試料から核酸を抽出する必要のある遺伝子工学の分野等においては特に有用な方法である。

前記した様に、本発明は極めて簡便な操作により実施可能であるから、これを自動化することも可能である。

また、本発明では、同一の反応容器内ですべての操作を実施することが可能であり、また、カラム等による沈殿の分離・除去も必要ではないから試料の損失が少なく、従って高い収率で核酸を抽出し又は蛋白質を損失することなく核酸を除去することが可能である。同一の反応容器内ですべての操作を実施することが可能であることは、例えば抽出又は除去されるべき核酸が危険なウイルスDNA等であり、試料が該ウイルスに感染した細胞である場合には、その汚染を最少限にすることが出来ることをも意味している。

#### (実施例)

以下本発明を更に詳細に説明するために実施例を記載するが、これら実施例は一例であって本発明を限定するものではない。

らの酵素による反応は阻害されることはなかった。また、抽出された核酸を錫型としたDNAポリメラーゼによる複製反応も阻害されなかった。これらの結果は、ヒストン等の制限酵素阻害物質が除去されていることを示すものである。

#### 実施例 2

ヒト白血球の癌細胞であるK562細胞を実施例1と同様にして培養した。培養懸濁液1ml当たり50万細胞となった時点で1mlの懸濁液をサンプリングチューブに取得し、500rpmで5分間遠心分離して細胞を回収した。

遠心後、上清を捨て、細胞に5Mチオシアニン酸グアニジン、1mMEDTAを含む10mMTri-s-塩酸緩衝液(pH8.0)を0.4ml添加した後、室温で1分間攪拌し、次いで99.5%エタノールを1ml添加した。続いて該溶液を四フッ化エチレン製メンブレン(NORTON社製、ZITE X、孔径=middle)により滤過し、核酸を回収した。

#### 実施例 1

ヒト白血球の癌細胞であるK562細胞（該細胞は著名な細胞であり、例えば大日本製薬（株）から購入することができる）を1%牛胎児血清を含むPRM1-1640培地で培養した。培養懸濁液1ml当たり50万の細胞となった時点で1mlの懸濁液をサンプリングチューブに取得し、500rpmで5分間遠心分離し、沈殿に細胞を回収した。

細胞に対して5Mチオシアニン酸グアニジン、1mMEDTAを含む10mMTri-s-塩酸緩衝液(pH8.0)を0.4ml添加した後、室温で1分間攪拌し、次いで99.5%エタノールを1ml添加した。続いて該溶液を15000rpmにて5分間遠心分離し、沈殿に核酸を抽出した。

上清を捨て、沈殿に70%エタノールを添加して洗浄した後乾燥処理し、核酸を得た。

以上の様にして抽出された核酸について制限酵素(Bam HI、Eco RI、Alu I)、RNase、DNaseを作用させた結果、これ

濾過後、該メンブレンを70%エタノールにて洗浄し、乾燥を行い、緩衝液中で核酸を取得した。

以上の様にして抽出された核酸について実施例1と同様の試験を実施したところ、すべての反応は阻害されることなく達成された。

#### 実施例 3

プラスミドpIB176(IBI社製)で軽質転換された大腸菌JM109株をLB培地にて培養した。

懸濁液1ml当たり1億細胞となった時点でその0.1mlをサンプリングチューブに取得し、8Mの塩酸グアニジンを0.3ml添加した後、1分間攪拌した。攪拌後、0.2mlの99.5%イソプロパノールを添加、攪拌し、15000rpmで5分間遠心分離を行い、核酸を抽出した。

上清を捨て、沈殿を70%エタノールにて2回洗浄した後、1mMEDTAを含む10mMTri-s-塩酸緩衝液(pH8.0)0.4mlに溶解し、15000rpmで5分間遠心分離して夾雜物を除去

した。

上記の様にして得られた上清に 1 ml の 99.5% エタノールを添加し、15000 rpm で 5 分間遠心分離して得られた沈殿を乾燥して実施例 1 と同様の試験を実施したところ、全ての酵素の反応は阻害されずに達成された。

#### 実施例 4

ヒト白血球の癌細胞である K562 細胞を LB 培地で培養した。培養懸濁液 1 ml 当り 50 万細胞となった時点で 1 ml の懸濁液をサンプリングチューブに取得し、500 rpm で 5 分間遠心分離して細胞を回収した。

沈殿に 8 M 尿素、1 mM EDTA を含む 10 mM Tris - 塩酸緩衝液 (pH 8.0) を 0.4 ml 添加した後、室温で 1 分間振拌し、次いで 99% セカンドグリープチルアルコールを 1 ml 添加した。続いて該溶液を実施例 2 で使用したのと同様の四フッ化エチレン製メンブレンにより滤過した。滤過後、該メンブレンを 70% エタノールにて洗浄し、乾

EDTA を含む 10 mM Tris - 塩酸緩衝液 (pH 8.0) 50 μl 中に溶解した。

DNA 合成器 (Applied Biosystems 社製) を使用して図 2 に示される塩基配列からなる前記した塩基配列に相補的な配列を有する合成 DNA を作製した。作製された DNA の 5' 末端をアミノ化し、アルカリ性フォスファターゼを結合させた。この DNA をプローブとしてドットプロット法により前記配列を検出した。

M13 ファージ DNA については発色が観察されたが、対象として使用した牛血清については何等発色は観察されなかった。このことは、本発明によれば高濃度蛋白質 (牛血清) 溶液中から、微量の DNA (BLV の DNA) が抽出可能であることを示すものである。

#### 4 図面の簡単な説明

第 1 図は、本発明の実施例 5 で使用された BLV DNA の一部分を示す図である。図中の記号は通常の遺伝子学において使用される記号の同様の

様を行い、緩衝液中で核酸を取得した。

以上の様にして抽出された核酸について実施例 1 と同様の試験を実施したところ、すべての反応は阻害されることなく達成された。

#### 実施例 5

BLV (Bovine Leukemia Virus ; VIROLOGY、第 138 卷、第 82 頁、1984 年) の DNA を M13 ファージ (Takara 社製) 中の Bam HI サイトに組込んだ。なお、参考のため、BLV DNA の一部分を参考のため第 1 図に示す。

100 μl 牛血清中に 1 ng の DNA を有する M13 ファージを添加し、該血清に 300 μl の 6 M グアニジンイソシアネートを添加して 1 分間振拌した。

該溶液にキャリアーとして 10 μl の 10 mg/ml のサーンモン DNA と 1 ml のエタノールを添加した後 1 分間振拌し、15000 rpm で 5 分間遠心分離した。上清を捨て、沈殿を乾燥させ、1 ml

意味である。また、図中、下線を付した部分は図 2 に示される DNA と特異的に対合する部分を示すものである。

第 2 図は、本発明の実施例 5 で使用された、第 1 図に示す DNA 中、下線を付した部分に対して特異的に対合する DNA の塩基配列を示すものである。

特許出願人

東ソー株式会社

## 第1回 - 1

(5') 20  
 GACCCCTAGGGCCATCATCCA  
 CTGGGATCCCGGTAGTAGGT  
 40  
 GCTTTCCCCGGAACAGCTGC  
 CGAAAGGGCCTTGTGACG  
 60  
 AAGGCATTGCAGAGCTTCGA  
 TTCCGTAACGTCTCGAAGCT  
 80  
 CAAGCCCTGTCACCACAAACGC  
 GTTCGGGACAGGGTGTGCG  
 100  
 AAGATCTAGATATAACGAGC  
 TTCTAGATCTATATTGCTCG  
 120  
 AAGAACCCCTGCTAGCCTAC  
 TTCTTGGGACCGATCGGATG

## 第1回 - 2

140  
 GTACACCTAACCCGGGGCGGG  
 CATGTGGATTGGGCCCCGCC  
 160  
 GTCCACCCCTGGTACTCTTCC  
 CAGGTGGGACCATGAGAAGG  
 180  
 AAAAGGGCGCTCAATTTC  
 TTTTCCCGCGAGTTAAAGGG  
 200  
 CTGGCCCTACTTTCAGACCCC  
 GACCGGATGAAAGTCTGGGG  
 220  
 CTTGACTGACAACCAAGCCT  
 GAAC TGACTGTTGGTTCGGA  
 240  
 CACCTTGGGGCCCTCCTCTC  
 GTGGAACCCCGGAGGAAGAG

## 第1回 - 3

260  
 CTGCTGGGATGCCAATACCT  
 GACGACCCCTACGGTTATGGA  
 280  
 GCAGACTCAGGCCCTTAAGCT  
 CGTCTGAGTCCGGAAAGGCGA  
 300  
 CGTATGCCAAGCCCATACTC  
 GCATACGGTTCGGGTATGA  
 320  
 AAATATTATCACAAATCTTCC  
 TTTATAATAGTGTAGAAGG  
 (3')  
 TAAAAACCTCT  
 ATTGAGA

## 第2回

(5') AGAGGTTTAGGAAGATTGT  
 GATA  
 (3')